

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-261766

(43)公開日 平成6年(1994)9月20日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 FI 技術表示箇所  
C 1 2 N 15/54 ZNA  
C 1 2 P 13/08 A 2121-4B  
// (C 1 2 N 15/54  
C 1 2 R 1:13)

9050-4B

C 1 2 N 15/ 00

A

審査請求 未請求 請求項の数8 OL (全 28 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-55451

(22)出願日 平成5年(1993)3月16日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 佐藤 幸江

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 畚野 信剛

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 山本 隆也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA及び

(57)【要約】 その利用

【構成】 AEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したブレビバクテリウム・フラバムMJ233から単離した、L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【効果】 このフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたブレビバクテリウム・フラバムMJ233株は、L-リジンの生成量が顕著に増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プレビバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 プレビバクテリウム属細菌がプレビバク

テリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ 233である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

```

GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCTCGCTTG AGAGTGGGA ACGCATTAGA 60
AACGTCGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATAATGTCGT GGTGTCTGTC 120
TCCGCAATGG GAGACACCAC GGATGAGCTT CTAGAACTTG CTGGGCGAGT GAATCCCGTT 180
CCGCCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCCTG ACTGCTGGTG AGCGTATTTT TAACGCTCTC 240
GTCGCCATGG CTATTGAGTC CCTGGGTGCA GAGGCTCAAT CTTTCACGGG TTCTCAGGCT 300
GGTGTGCTCA CCACCGAGCG TCACGGAAGC GCAOGCATTG TTGATGTCAC TCCAGGTCGT 360
GTGCGTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCAATTGTTG CTGGTTTCCA GGGTGTCAAT 420
AAGGAAACCC GCGATGTCAC CACGTTGGGT CGCGGTGGTT CTGATACCAC TGCAGTTGCA 480
TTGGCAGCTG CTCTGAACGC TGATGTGTGT GAGATTACT CAGATGTTGA CGGCGTGTAC 540
ACCGCTGACC CGGCGATCGT TCCTAATGCT CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTTCGAAGAA 600
ATGCTGGAAC TTGCTGCTGT TGGCTCCAAG ATTTTGGTGC TACGCAGTGT TGAATACGCT 660
CGTGCAATCA ATGTGCCACT TCGCGTACGC TCGTCTTATA GCAATGATCC CGGCACCTTG 720
ATTGCCGGCT CTATGGAGGA TATTCCTGTG GAAGAAGCAG TCCTTACCGG TGTCCGAACC 780
GACAAGTCCG AAGCCAAAGT AACCGTTCTG GGTATTTCCG ATAAGCCAGG CGAGRYTGGC 840
AAGGTTTTCC GTGCGTTGGC TGATGCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900
TYCTCTGTGG AAGACGGCAC CAYCGACATC ACGTTCACCT GCGCTCGCTC TGACGGACGC 960
CGTGCGATGG AGATCTTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTTAC 1020
GACGACCAGG TCGGCAAAGT CTCCTCTGCTG GGTGCGGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080
ACCGCAGAGT TCATGGAAGC TCTGCGCGAT GTCAACGTGA ACATCGAATT GATTTCACCC 1140
TCTGAGATCC GCATTTCCGT GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGCAAGTGCA 1200
CTGCATGAGC AGTTCCAGCT GGGCGGCGAA GACGAAGCCG TCGTTTATGC AGGCACCGGA 1260
CGC

```

(配列中、835番目のRはG又はAを示し、836番目、902番目および923番目のYはC又はTを示し、同時に、835番目のRがGであり、836番目、902番目および923番目のYがCであることはな

い。)で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

```

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1      5      10      15
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20     25     30
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35     40     45
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50     55     60
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65     70     75     80
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
85     90     95
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
100    105    110
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
115    120    125
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
130    135    140
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala

```

145                      150                      155                      160  
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
                                  165                      170                      175  
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
                                  180                      185                      190  
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
                                  195                      200                      205  
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
                                  210                      215                      220  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
 225                      230                      235                      240  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
                                  245                      250                      255  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
                                  260                      265                      270  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu AAA Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
                                  275                      280                      285  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val YYY Ser Val Glu  
                                  290                      295                      300  
 Asp Gly Thr ZZZ Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
 305                      310                      315                      320  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
                                  325                      330                      335  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
                                  340                      345                      350  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
                                  355                      360                      365  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
                                  370                      375                      380  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Arg Ala  
 385                      390                      395                      400  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
                                  405                      410                      415  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
                                  420

(配列中、279番目のAAAはAla又はThr又はValを示し、301番目のYYYはSer又はPheを示し、308番目のZZZはThr又はIleを示し、同時に、279番目のAAAがAlaであり、301番目のYYYがSerであり、308番目のZZZがThrであることはない。)で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項8】 グルコースを、請求項7記載のコリネ型細菌の培養菌体又は菌体処理物と接触させてL-リジンを生成せしめることを特徴とするL-リジンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、プレバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌及び該コリネ型細菌を用いるL-リジンの製造法に関する。

【0002】 L-リジンは、必須アミノ酸として蛋白質中にその存在が知られ、医薬や食品添加物として用いられている。

### 【0003】

【従来の技術】従来、L-リジンの工業的製造法としては、グルタミン生産菌であるコリネ型細菌の各種栄養要求株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を用いてL-リジンを製造する方法が知られている【例えば、特公昭51-21078号公報、特公昭53-1833号公報、特公昭62-8692号公報等参照】。また、組換え菌を用いた製造法も提案されている【特開昭56-160997号公報、特開昭60-62994号公報、特開昭62-79788号公報等参照】。しかしながら、従来提案されている方法によるL-リジンの製造法では、対糖収率が低く及び又はL-リジンの蓄積に限界があり、新たな観点から、遺伝子工学的手法による菌株の改良等を含め、L-リジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0004】L-リジン生合成経路において、L-アスパラギン酸を初発とする第一ステップでアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)によりL-アスパラギン酸にリン酸が付加される。該アスパルトキナーゼは、最終生成物であるL-リジンにより阻害を受ける、即ちフィードバックインヒビションを受け、培地中にある濃度以上L-リジンを蓄積させることができない。このことが、微生物を用いるL-リジンの製造上の問題となっていた。

【0005】一方、アスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子としては、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)由来の遺伝子【*Journal of Biological Chemistry*, 256, 10228~10230, 1981参照】がよく研究されている。また、グラム陽性細菌由来のアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)としては、バチルス・サチルス(*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)等が知られている【*Journal of Biological Chemistry*, 262, 8787-8798, 1987; *Molecular Microbiology*, 5, 1197-1204, 1991参照】。しかしながら、プレバクテリウム属由来のアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子については従来の報告例は見当たらない。

【0006】本発明者等は、先にプレバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*) MJ233株染色体より、アスパルトキナーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-リジンを製造しうることを見出し提案した(特願平4-24658号明細書参照)。

### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、プレバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子DNAを単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点からさらに効率的にL-リジンを製造することである。

### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(以下これを「AEC」と略称することがある)耐性を有するプレバクテリウム属細菌染色体より、L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAが単離可能であり、該遺伝子DNAを適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、さらに効率的にL-リジンを製造し得ることを見出し本発明を完成するに至った。

【0009】かくして本発明によれば、

- (1) プレバクテリウム属細菌由来のL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (2) 後記配列表の配列番号6で示されるDNA塩基配列で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (3) 後記配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列で表されるL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;
- (4) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド;
- (5) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌;及び
- (6) 該形質転換されたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてL-リジンを製造する方法が提供される。

【0010】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「L-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA」とは、AECを含有するプレートに生育可能なコリネ型細菌のうち、リジンの生育量が増加した株の染色体より抽出したアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA、すなわちL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ(E. C. 2. 7. 2. 4.)をコードする遺伝子DNAを意味するものである。

【0011】本発明のL-リジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼをコー

ドする遺伝子を含むDNA断片（以下、これを「A断片」と略称することがある）は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常はAEC耐性を有するアスパルトキナーゼ生産性微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、AEC耐性を有するプレバクテリウム属細菌、殊にAEC耐性を有するプレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ 233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0012】すなわち、A断片の好適な供給源微生物としてはアスパルトキナーゼ生産性微生物を変異処理し、AEC耐性を有しかつL-リジンの生産性の増加した微生物が使用される。変異処理を行なう微生物としては、上記したプレバクテリウム属細菌、殊にプレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ 233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0013】これらの微生物を変異処理してA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである：まず、プレバクテリウム・フラバム MJ 233 にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン処理により変異を誘起せしめた後、この菌懸濁液をAEC 10 g/l 含有する平板培地〔尿素0.2%、硫酸0.7%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6 mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6 mg/l、ローピオチン200  $\mu\text{g}$ /l、チアミン塩酸塩100  $\mu\text{g}$ /l、寒天20 g/l、グルコース2%（滅菌後添加）〕に塗抹し、し、30℃にて3日間培養し、生じたコロニーを分離することにより、AECに耐性を有する変異株プレバクテリウム・フラバム MJ 233を得ることができる。

【0014】上記のようにして得られた変異株を好氣的に培養して、培地中に生成蓄積するL-リジンの含量が親株より増加しているものをさらに選抜することにより、AEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバム MJ 233を取得することができる。かくして得られるA断片の供給源となる微生物の好適具体例として以下の菌株を挙げることができる。

【0015】プレバクテリウム・フラバム MJ 233-Leu-AEC-Lys 163 (FERM P-13512)、プレバクテリウム・フラバム MJ 233-AEC-Lys 84 (FERM P-13511)、プレバクテリウム・フラバム MJ 233-AEC-Lys 242 (FERM P-13513)、プレバクテリウム・フラバム MJ 233-AEC-Lys 40 (FERM P-16510)。

【0016】これら変異株の菌学的性質は、AEC耐性

およびL-リジン生産性増加を除いては、親株であるプレバクテリウム・フラバム MJ 233と同様である

（菌学的性質については、特開昭51-130592号公報参照）。次に、上記したAEC耐性を有し、かつL-リジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバム MJ 233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0017】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399（宝酒造製）に挿入し、このベクターを用いて、アスパルトキナーゼ遺伝子が欠損した大腸菌（エシェリヒア・コリ）変異株CGSC5074（エシェリヒア・コリ ジエネテック・ストック センター (*Escherichia coli* Genetic Stock Center)、デパートメント・オブ・バイオロジー、ユール・ユニバーシティ (Department of Biology, Yale University) ; P. O. Box 6666 New Haven, CT 06511-744, U. S. A. 保存菌株) を形質転換し、AECを含有する選択培地に塗抹することにより、形質転換株を取得する。

【0018】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたAEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバム MJ 233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを、通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により、これを前記アスパルトキナーゼが欠損した大腸菌変異株に導入し、AECを含有する選択培地に塗抹する。

【0019】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたAEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバム MJ 233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、上記AEC耐性を有しかつL-リジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバム MJ 233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素NruIで切断することによって得られる大きさが約1.7 kbのDNA断片を挙げることができる。

【0020】この約1.7 kbのL-リジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に、制限酵素による切断点地図を図1にそ

れぞれ示す。  
【0021】

【表1】

表1		
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (k b)
Pvu II	3	0. 1、0. 2、0. 7、0. 7
Dra I	1	0. 2、1. 5
Hinc II	2	0. 3、0. 6、0. 7
Hind III	1	0. 4、1. 2
Bgl II	2	0. 5、0. 6、0. 6
Pst I	2	0. 4、0. 6、0. 7
Nco I	1	0. 5、1. 2
Xba I	1	0. 4、1. 3

【0022】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0023】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ ( $\lambda$  phage) のDNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ ( $\phi$ x174 phage) のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1k b以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0. 1k bから1k b未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0024】一方、上記のAEC耐性を有しかつレーリジン生産性の増加したプレバクテリウム・フラバムMJ233の染色体DNAを制限酵素NruIおよびEcoRIによって切断することにより得られる大きさが約1. 7k bのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideox ychain termination法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した上記約1. 7k bのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したレーリジンによる

フィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号2~5に示す配列を有するものであり、421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対から構成されている。

【0025】なお、後記配列表の配列番号1に、比較対照としてAECを含有しない選択培地を用いた他は同様の方法で単離・配列を決定したプレバクテリウム・フラバムMJ233染色体由来のアスパルトキナーゼ遺伝子 (以下これを「野生型のアスパルトキナーゼ遺伝子」と言うことがある。) DNAの配列を示す。また、配列番号2に前記MJ233-Leu-AEC-Lys163株より得られた配列、配列番号3にMJ233-AEC-Lys84株より得られた配列、配列番号4にMJ233-AEC-Lys242株より得られた配列、配列番号5にMJ233-AEC-Lys40株より得られた配列をそれぞれ示す。

【0026】後記配列表の配列番号1~5に示される配列から明らかとなっており、レーリジンによりフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAは、野生型のアスパルトキナーゼ遺伝子DNAと比較して、835番目、836番目、902番目、923番目の塩基がそれぞれGからA、CからT、CからTに変異することによって、279番目、279番目、301番目、308番目のアミノ酸がそれぞれAlaからThr、AlaからVal、SerからPhe、ThrからIleに変化したものである。

【0027】また、逆に、この配列をもとにして、サイトダイレクトミュータジェネシス (Site-directed mutagenesis法、Kramer, W. et. al. Nucl. Acids Res., 12, p9441, 1984) を用いて人為的に変異を導入することによっても、AEC耐性を付与する変異型アスパルトキナーゼ遺伝子を得ることができる。

【0028】これらの結果から、本発明のレーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNAは、後記配列表の配列番号6に示される塩基配列又は配列番号7に示されるアミノ配

列で表されるDNAであることが判明した。上記の塩基配列を包含する本発明のLーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のAEC耐性を有するプレバクテリウム属細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0029】また、前記の如くAEC耐性を有するプレバクテリウム・フラバムMJ233変異株の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、Lーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0030】本発明のLーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)は、適当なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でアスパルトキナーゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0031】また、本発明のLーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アスパルトキナーゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0032】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG

11等を挙げることができる。

【0033】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0034】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレバクテリウム・スタチオニス(*Brevibacterium stationis*)IFO12144(FERM BP-2515)からプラスミドpBY503(このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照)DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片(以下これを「複製機能領域」と言うことがある。)を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片(以下これを「安定化機能領域」と言うことがある。)を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298(宝酒造製)のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0035】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0036】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.7kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、Lーリジンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-AK835と命名した。プラスミドpCRY30-AK835の作成方法の詳細については、後記実施例5で説明する。

【0037】このようにして造成されるLーリジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてLーリジンを安定に効率より生産することが

可能となる。本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビパクリウム・フラバムMJ 233 (FERM BP-1497)、プレビパクリウム・フラバムMJ 233-A B-41 (FERM BP-1498)、プレビパクリウム・フラバムMJ 233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレビパクリウム・フラバムMJ 233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0038】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- $\alpha$ -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール産性微生物である(特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である(特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERMBP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0039】これらの微生物の他に、プレビパクリウム・アンモニアゲネス(Brevibacterium ammoniagenes) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746; プレビパクリウム・デバリカタム(Brevibacterium divaricatum) ATCC14020; プレビパクリウム・ラクトファーメンタム(Brevibacterium lactofermentum) ATCC13869; コリネパクリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0040】なお、宿主としてプレビパクリウム・フラバムMJ 233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502(特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である[Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0041】宿主プレビパクリウム・フラバムMJ 233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ(濃度: 0.2~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) もしくはエチジウムブロミド(濃度: 0.2~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 等を含む培地に、1ml 当り約10細胞になるように植菌し、生

育を不完全に阻害しながら約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビパクリウム・フラバムMJ 233由来菌株が得られる。

【0042】このようにして得られるプレビパクリウム・フラバムMJ 233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように[Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電[Sato, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照]によりプラスミドを導入することが可能である。

【0043】上記の方法で形質転換して得られるL-リジンによるフィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼ産性能を有するコリネ型細菌、例えばプレビパクリウム・フラバムMJ 233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0044】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20~約40℃、好ましくは約25℃~約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5~10、好ましくは7~8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間とすることができ、最適期間は3日間である。

【0045】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-リジン生成反応に使用することができる。L-リジン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破砕物、さらに



それから分離回収した粗酵素又は精製酵素として、あるいはそれらを適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物や粗または精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0046】しかして本発明に従えば、グルコースを、上記培養菌体又は菌体処理物と接触させて、L-リジンを生成せしめることからなるL-リジンの製造法が提供される。グルコースと上記培養菌体又は菌体処理物との接触は、通常の酵素反応と同様に、水性媒体中において、好ましくは約20～約40℃、特に約25～約35℃において行なうことができる。

【0047】生成するL-リジンは例えば、高速液体クロマトグラフィー等の手段により反応液から分離回収することができる。

【0048】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

参考例1

プレバクテリウム・フラバムMJ233由来のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のクローニング

【0049】(A) プレバクテリウム・フラバムMJ233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.5g、 $\text{MgSO}_4$ 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim6\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g、蒸留水1リットル〕1リットルに、プレバクテリウム・フラバムMJ233(FERM BP-1497)を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH8.0)-1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000 $\times g$ 、20分間、10～12℃)し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5)-1mM EDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0050】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ233の全DNA溶液の90 $\mu\text{l}$ を制限酵素EcoRI 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI分解DNAにクローニングベクターpHSG399(宝酒造より市販)を制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM  $\text{MgCl}_2$ 及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0051】(C) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選択に用いたアスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株は、エシェリヒア・コリCGSC5074(thr A1101, lys C1001, met L1000)である〔( )内はアスパルトキナーゼ遺伝子型(Genotype)を示す〕。

【0052】上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地〔 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解〕に塗抹した。

【0053】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約3.8kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpHSG399-AKと命名した。

【0054】(D) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A)断片のサブクローニング

上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC119(宝酒造より市販)へアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0055】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKを制限酵素EcoRI、NruIで切断したものと、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SmaIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM  $\text{MgCl}_2$ 及びT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合

させた。

【0056】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地 [ $K_2HPO_4$  7g,  $KH_2PO_4$  2g,  $(NH_4)_2SO_4$  1g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1g, グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解] に塗抹した。

【0057】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を

表2 プラスミドpUC119-AK		
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	4.9
Bgl II	2	4.2, 0.6
Hind III	2	3.6, 1.2

【0060】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC119-AKと命名した。以上によりアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約1.7kbのDNA断片 (NruI-EcoRI断片) を得ることができた。

【0061】参考例2

アスパルトキナーゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の(D)項で得られたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む長さが約1.7kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0062】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対より構成されていることが判明した。

【0063】参考例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレビパテリウム・スタチオニスIFO12144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。

【0064】半合成培地A培地 [尿素2g,  $(NH_4)_2SO_4$  7g,  $K_2HPO_4$  0.5g,  $KH_2PO_4$

を用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ

3.2kbのDNA断片に加え、長さ約1.7kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約1.7kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したものと同様であり、このDNA断片の制限酵素切断点地図も図1に示したものと同様であった。

【0058】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0059】

【表2】

40.5g,  $MgSO_4$  0.5g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  6mg,  $MnSO_4 \cdot 4 \sim 6H_2O$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピチオン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g及び蒸留水1リットル] 1リットルに、プレビパテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液 [25mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン, 10mMEDTA, 50mMグルコース] 20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液 [0.2N NaOH, 1% (W/V) SDS] 40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5M酢酸カリウム溶液60ml, 酢酸11.5ml, 蒸留水28.5mlの混合液] 30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0065】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液 (フェノール:クロロホルム=1:1混和液) を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0066】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液 [トリス10mM, EDTA 1mM; HClにてpH8.0に調整] 2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液 [5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液] 15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、11

6, 000×gの遠心分離を行った。

【0067】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見出しされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後TE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15, 000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

【0068】

(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298(宝酒造製) 0.5μgに制限酵素SalI(5units)を37℃1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2μgに制限酵素XhoI(1unit)を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。

【0069】両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4 DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換した。

【0070】形質転換株は30μg/ml(最終濃度)のカナマイシン、100μg/ml(最終濃度)のIPTG(イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド)100μg/ml(最終濃度)のX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルーβ-D-ガラクトピラノシド)を含むL培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1リットル、pH7.2)で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法(T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90~91参照)により抽出した。

【0071】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kb

のDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0072】参考例4

プラスミドpCRY30-AKの作成及びコリネ型細菌への導入

参考例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG399-AK5μgを制限酵素EcoRIおよびNruIを各5units用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、EcoRIリンカー(宝酒造より市販)1μlを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0073】このDNAを制限酵素EcoRI 3unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、参考例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素EcoRI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSG5074株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解]に塗抹した。

【0074】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ約1.7kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0075】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレバクテリウム・フラバムMJ233(FERM BP-1497)プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのバルス用溶液(272mM sucrose、7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlのバルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーン

バルサー（バイオラド社製）を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルス印加後氷中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml（最終濃度）を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2〜3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施

例3（A）項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

【0076】

【表3】

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	1	10.4
KpnI	1	10.4
SacI	1	10.4
XhoI	1	10.4
EcoRI	2	1.7、8.7
XbaI	2	3.4、7.0
SphI	3	1.7、2.1、6.6
PstI	4	0.4、1.7、3.3、5.0

【0077】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AKと命名した。なお、プラスミドpCRY30-AKにより形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-AKは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、微工研菌寄第12658号（FERM P-12658）として寄託されている。

【0078】実施例1

プレバクテリウム・フラバムMJ233のAEC耐性変異株の取得

1) AEC耐性株の分離

培地（尿素0.4%、硫酸1.4%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.05%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O0.05%、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O6mg/l、MnSO<sub>4</sub>・4~6H<sub>2</sub>O6mg/l、ビオチン200μg/l、チアミン塩酸塩100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）50mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌し、pH7に調節した後、プレバクテリウム・フラバムMJ233を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行なった。

【0079】菌体を回収し、TMバッファー（Tris24.2g/l、マレイン酸23.2g/lの液を25mlと0.2N NaOH15mlを混合し、100mlにメスアップする）5mlで1回洗浄を行なった。N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジン300μg/mlを含む上記TMバッファーに菌を懸濁し、30℃で2時間インキュベートした。

【0080】この菌体処理液を上記培地（カザミノ酸、酵母エキスを除く）にて2回洗浄したのち、AEC10g/lを含有する平板培地（尿素0.2%、硫酸0.7%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.05%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O0.05%、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O6mg/l、MnSO<sub>4</sub>・4~6H<sub>2</sub>O6

mg/l、ロービオチン200μg/l、チアミン塩酸塩100μg/l、寒天20g/l、グルコース2%（滅菌後添加））に塗抹し、30℃にて3日間培養し、生じたコロニーを分離した。

【0081】次に生じたコロニーを100mlの上記培地を用いて培養し、集菌後2回洗浄し、L-リジンの定量を行なった。L-リジンの定量は、高速液体クロマトグラフィー（島津LC-5A）を用いて行なった。この結果、AEC耐性株中にL-リジンの生成量が、野生型に比べて著しく増大した株が存在し、これを次のとおり命名した。

【0082】プレバクテリウム・フラバムMJ233-Leu-AEC-Lys163（FERM P-13512）、プレバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys84（FERMP-13511）、プレバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys242（FERMP-13513）、プレバクテリウム・フラバムMJ233-AEC-Lys40（FERMP-13510）。

【0083】上記した各菌株は、茨城県つくば市東1丁目1番1号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。これらの菌株を以下の実験に用いた。

【0084】

2) AEC耐性株のアスパルトキナーゼ活性の測定

培地（尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.05%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O0.05%、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O2ppm、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O2ppm、MnSO<sub>4</sub>・4~6H<sub>2</sub>O2ppm、ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O2ppm、NaCl2ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）10mlを24φ試験管に分注、滅菌（滅菌後pH7.0）した後上記1)項で得たAEC耐性を有するプレバクテリウム・フラバ

ム (*Brevibacterium flavum*) を各々植菌し、無菌的にグルコースを5 g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0085】次に、本培養培地(グルコース5%、硫酸アンモニウム2.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20 ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  20 ppm、ビオチン200  $\mu\text{g/l}$ 、チアミン $\cdot\text{HCl}$  100  $\mu\text{g/l}$ 、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.3%)の100 mlを500 ml容三角フラスコに分注、滅菌(120℃、20分間)後、前記前培養物の1 mlを添加して温度33℃にて24時間培養を行った。

【0086】培養終了後、培養物100 mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて洗浄した菌体を100 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.8)で1回洗浄後、同緩衝液を2 ml添加し、ガラスビーズ1 gを加えた。超音波にて菌体を破砕した後、12,000 rpm、40分間遠心し上清を得た。アスパルトキナーゼ活性を測定する反応液[アスパラギン酸カリウム(pH 8) 10 mM、ATP 20 mM、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  30 mM、 $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$  (pH 8) 100 mM、ヒドロキシルアミン600 mM]に調製した上清0.1 mlを加え全体を1 mlにしたのち、37℃で1時間反応させた。これに2.5 mlの呈色液[5%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ と、12% TCAと3N  $\text{HCl}$ を等量混合したもの]を添加し、遠心後上清の540 nmの吸光度を測定した。

【0087】反応液にスレオニン(Thr)、リジン(Lys)をまったく無添加のときの値を100とし、これに対するThr、Lysをそれぞれ100 mM、200 mM添加したときの割合を、脱感作度と定義した。野生型の株のアスパルトキナーゼの脱感作度は0%であるのに対し、変異株MJ233-Leu-AEC-Lys163、MJ233-AEC-Lys84、MJ233-AEC-Lys242、MJ233-AEC-Lys40ではそれぞれ70%、50%、80%、40%であった。すなわちAEC耐性の変異株1、2、3、4、では、アスパルトキナーゼがLys、Thrに対するフィードバックインヒビションが解除されていることが確認された。

#### 【0088】実施例2

##### フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の単離および同定

実施例1で得られた各菌株を同様の培地で培養し以下の方法で染色体DNAを回収した。

【0089】得られた菌体を10 mg/mlの濃度にリゾチームを含む10 mM  $\text{NaCl}$ -20 mMトリス緩衝液(pH 8.0)-1 mM EDTA-2 Na溶液15 mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が

100  $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この容菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000  $\times g$ 、20分間、10~12℃)し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10 mMトリス緩衝液(pH 7.5)-1 mM EDTA-2 Na溶液5 mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0090】次に、上記で各菌株から得られた染色体DNAを制限酵素EcoRI、NruI各10 unitsで完全に分解し、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SmaI各2 unitsで切断したものを各々混合し、50 mMトリス緩衝液(pH 7.6)、10 mMジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 及びT4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し12℃で16時間反応させ結合させた。

【0091】得られた各プラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology 53, 159, 1970)により、前記アスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株、エシェリヒア・コリCGSC5074(thr A1101, lys C1001, met L1000) [( )内はアスパルトキナーゼ遺伝子型(genotype)を示す]を各々形質転換し、アンピシリン50 mgを含む選択培地[ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub> $\text{SO}_4$  1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g、グルコース20 g、寒天16 g、1リットルにメスアップ)に各々塗抹した。生育してきた各コロニーをAEC5 g/lを含む同選択培地に各々塗抹し、AEC耐性であることを確認した。

【0092】この各々の培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液より各プラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により各々切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ3.2 kbのDNA断片に加え、長さ約1.7 kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約1.7 kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは、各変異株から得られたものとも同種であり、前記表1に示したとおりであった。

【0093】また上記で得たMJ233-Leu-AEC-Lys163より得られた1.7 kbのDNA断片が導入されたプラスミド(プラスミドpUC119-AK835)を各種制限酵素で切断して、切断断片の大き

さを測定した。その結果を下記の表4に示す。

【表4】

【0094】

表4 プラスミドpUC119-AK835		
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	4.9
Bgl II	2	4.2, 0.6
Hind III	2	3.6, 1.2

【0095】なお、他変異株から得られた1.7kbのDNA断片が導入された各プラスミドの制限酵素認識部位数および切断断面片の大きさは表4に示したものと同様であった。

【0096】実施例3

フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の塩基配列の決定

実施例2で得られたフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子DNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119を用いるジスクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination法, Songer et. al., Proc. Natl. Acad. Res. USA., 74, 5463, 1977) により決定した。

【0097】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、フィードバックインヒビションが解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子は、後記配列表の配列番号2～5に示す塩基配列を有する421個のアミノ酸をコードする1263塩基対より構成されていることが判明した。その配列は、野生型のアスパルトキナーゼ配列 (配列番号1) と比べて、835番目のGがAに変異することにより279番目のアミノ酸がAlaからThrに変化したもの (配列番号2)、836番目のCがTに変異することにより279番目のアミノ酸がAlaからValに変化したもの (配列番号3)、902番目のCがTに変異することにより301番目のアミノ酸がSerからPheに変化したもの (配列番号4)、923番目のCがTに変化することにより308番目のアミノ酸がThrからIleに変化したもの (配列番号5) であることがわかった。

【0098】実施例4

サイトダイレクトミュータジェネシスによる人為的フィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼ遺伝子の作成

野生型アスパルトキナーゼ遺伝子がpUC119にクローニングされたプラスミドpUC119-AK (参考例1) を用いて下記の方法にて変異を導入した。

【0099】まず、pUC119-AKを含むエシェリヒア・コリJM109 (宝酒造製) にM13KO7ファージ (宝酒造製) を感染させて常法に従い1本鎖DNAを作製した。この1本鎖DNAと、pUC119を95℃、5分間加熱し急冷したものを混合し、アニーリング

させることにより、野生型アスパルトキナーゼ遺伝子部分が1本鎖でベクター部分が2本鎖である分子を形成させた。

【0100】これに実施例3で見出した変異部分を中央に含む25merの1本鎖合成DNAを4種類作製しそれぞれ混合した。さらにDNAポリメラーゼによりギャップを修復したのち、それぞれ、実施例1で使用了アスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株、エシェリヒア・コリCGSC5074株に導入し、AEC10g/lを含む前記選択培地に塗抹した。

【0101】生じたコロニーよりそれぞれプラスミドを抽出し、実施例3と同様の方法で塩基配列を決定したところ、それぞれ配列番号2～5に示した配列と全く同様の配列を有していた。

【0102】実施例5

プラスミドpCRY30-AK835の作成及びコリネ型細菌への導入

実施例2で得られたプラスミドpUC119-AK835 5μgを制限酵素EcoRIおよびNruIを各5units用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、EcoRIリンカー (宝酒造より市販) 1μlを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub> およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0103】このDNAを制限酵素EcoRI 3unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、参考例3の (B) 項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素EcoRI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub> およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む選択培地 [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解] に塗抹した。

【0104】この培地上の生育株を常法により液体培養

し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ1.7kbの挿入DNA断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0105】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレバクテリウム・フラバムMJ233 (FERM BP-1497) プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのパルス用溶液 (272mM Sucrose、7mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH7.4) にて洗浄した。さらに菌体を遠心分

離して集め、5mlのパルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50 $\mu$ lとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンパルサー (パイオラド社製) を用いて、2500ボルト、25 $\mu$ FDに設定し、パルスを印加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15 $\mu$ g/ml (最終濃度) を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3 (A) 項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表5に示す。

【0106】

【表5】

表5 プラスミドpCRY30-AK835		
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	1	10.4
KpnI	1	10.4
SacI	1	10.4
XhoI	1	10.4
EcoRI	2	1.7、8.7
XbaI	2	3.4、7.0
SphI	3	1.7、2.1、6.6
PstI	4	0.4、1.7、3.3、5.0

【0107】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AK835と命名した。なお、プラスミドpCRY30-AK835により形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-AK835は、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成5年3月4日付で受託番号: FERM P-13508として寄託されている。

【0108】実施例6

#### レーリジンの生産

培地 (尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン200 $\mu$ g/l、チアミン $\cdot$ HCl 100 $\mu$ g/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%) 10mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌 (滅菌後pH7.0) した後プレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ233-AK835 (FERM P-13508号) を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0109】次に、本培養培地 (グルコース5%、硫酸

アンモニウム2.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  20ppm、ビオチン200 $\mu$ g/l、チアミン $\cdot$ HCl 100 $\mu$ g/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%) の1000mlを2リットル容通気攪拌槽に仕込み、滅菌 (120℃、20分間) 後、前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間培養を行った。

【0110】培養終了後、培養物500mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液 [( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20ppm;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  20ppm; チアミン塩酸塩100 $\mu$ g/l; pH7.6] の1000mlに懸濁後、該懸濁液を2リットル容通気攪拌槽に仕込み、グルコース9gを添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間反応を行った。

【0111】反応終了後、遠心分離 (4000rpm、15分間、4℃) にて除菌した上清液中のレーリジンを定量した。この反応終了後の培養液500mlを、強酸性陽イオン交換樹脂 ( $\text{H}^+$ 型) のカラムに通してレーリ

ジンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、L-リジン画分を濃縮し、冷エタノールでL-リジンの結晶を析出させた。

【0112】また、比較例として、同様の条件にて、プレバクテリウム・フラバムMJ233 (FERM B P-1497) およびプレバクテリウム・フラバムM

J233-AK (FERM P-12658) を培養し、同様の条件にて反応させた後にL-リジンを定量し、同様の条件にてL-リジンの結晶を得た。それらの結果を表6に示す。

【0113】

【表6】

表6

菌株	プラスミド	L-リジン生成量	結晶析出量
MJ233-AK835	pCRY30-AK835	8.0 g/l	2000 mg
MJ233-AK	pCRY30-AK	1.5 g/l	400 mg
MJ233	---	0.6 g/l	120 mg

【0114】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1263

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: プレバクテリウム フラバム

株名: MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 1-1263

特徴を決定した方法: P

【0115】

配列

```

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1 5 10 15
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20 25 30
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35 40 45
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50 55 60
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65 70 75 80
GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
85 90 95
GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
100 105 110
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
115 120 125
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
130 135 140
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
145 150 155 160

```



TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT  
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
 165 170 175  
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG  
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
 180 185 190  
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC  
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
 195 200 205  
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT  
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
 210 215 220  
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
 245 250 255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
 260 265 270  
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
 275 280 285  
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu  
 290 295 300  
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
 305 310 315 320  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
 325 330 335  
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
 340 345 350  
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
 355 360 365  
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
 370 375 380  
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala  
 385 390 395 400  
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
 405 410 415  
 GCA GGC ACC GGA CGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
 420

【0116】配列番号:2

配列の長さ:1263

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:Genomic DNA

起源

生物名:プレビバクテリウム フラバム

株名: MJ233-Leu-AEC-Lys163

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 1-1263

特徴を決定した方法: E

【0117】

配列

```
GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1          5          10          15
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20          25          30
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35          40          45
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50          55          60
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65          70          75          80
GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
85          90          95
GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
100          105          110
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
115          120          125
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
130          135          140
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
145          150          155          160
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
165          170          175
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CGC CGC ATC GTT OCT AAT GCT CAG AAG
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
180          185          190
CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
195          200          205
TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
210          215          220
```

GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT OCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
 245 250 255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG ACT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Thr Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
 275 280 285  
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu  
 290 295 300  
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
 305 310 315 320  
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
 325 330 335  
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
 340 345 350  
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
 355 360 365  
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
 370 375 380  
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala  
 385 390 395 400  
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
 405 410 415  
 GCA GGC ACC GGA CGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
 420

【0118】配列番号：3

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレバクテリウム フラバム

株名：MJ233-AEC-Lys84

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

【0119】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG  
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1 5 10 15  
 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
 20 25 30  
 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT  
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
 35 40 45  
 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT  
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
 50 55 60  
 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC  
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
 65 70 75 80  
 GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG  
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
 85 90 95  
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC  
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
 100 105 110  
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC  
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
 115 120 125  
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC  
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
 130 135 140  
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA  
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala  
 145 150 155 160  
 TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT  
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
 165 170 175  
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CGC CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG  
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
 180 185 190  
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC  
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
 195 200 205  
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT  
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
 210 215 220  
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
 245 250 255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
 260 265 270  
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GTT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Val Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
 275 280 285

GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA  
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu  
290 295 300  
GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC  
Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
305 310 315 320  
CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC  
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
325 330 335  
AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
340 345 350  
GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG  
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
355 360 365  
CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC  
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
370 375 380  
ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA  
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala  
385 390 395 400  
CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT  
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
405 410 415  
GCA GGC ACC GGA CGC  
Ala Gly Thr Gly Arg  
420

【0120】配列番号: 4

配列の長さ: 1263

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: プレバクテリウム フラバム

株名: MJ233-AEC-Lys242

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 1-1263

特徴を決定した方法: E

【0121】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG  
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
1 5 10 15  
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT  
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
20 25 30  
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT  
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
35 40 45  
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT  
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
50 55 60  
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC  
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
65 70 75 80

GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG  
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
 85 90 95  
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC  
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
 100 105 110  
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC  
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
 115 120 125  
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC  
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
 130 135 140  
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA  
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala  
 145 150 155 160  
 TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT  
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
 165 170 175  
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CGC CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG  
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
 180 185 190  
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC  
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
 195 200 205  
 TOC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT  
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
 210 215 220  
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG  
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC  
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
 245 250 255  
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT  
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
 260 265 270  
 TOC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT  
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
 275 280 285  
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TTC TCT GTG GAA  
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Phe Ser Val Glu  
 290 295 300  
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC  
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
 305 310 315 320  
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
 325 330 335  
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

340 345 350  
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
 355 360 365  
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
 370 375 380  
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala  
 385 390 395 400  
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
 405 410 415  
 GCA GGC ACC GGA GGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
 420

【0122】配列番号：5

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：ブレヴィバクテリウム フラバム

株名：MJ233-AEC-Lys40

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

【0123】

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG  
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1 5 10 15  
 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT  
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
 20 25 30  
 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT  
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
 35 40 45  
 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT  
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
 50 55 60  
 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC  
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
 65 70 75 80  
 GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG  
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
 85 90 95  
 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC  
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
 100 105 110  
 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC  
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
 115 120 125  
 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC  
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg

130	135	140
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA		
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		
145	150	155
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT		
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val		
165	170	175
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG		
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys		
180	185	190
CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC		
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly		
195	200	205
TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT		
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn		
210	215	220
GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG		
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu		
225	230	235
ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC		
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr		
245	250	255
GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT		
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile		
260	265	270
TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT		
Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp		
275	280	285
GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA		
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu		
290	295	300
GAC GGC ACC ATC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC		
Asp Gly Thr Ile Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg		
305	310	315
CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC		
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr		
325	330	335
AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG		
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala		
340	345	350
GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG		
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu		
355	360	365
CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC		
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg		
370	375	380
ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA		
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala		
385	390	395
CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT		
		400



Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
 405 410 415  
 GCA GGC ACC GGA CGC  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
 420

【0124】配列番号：6

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1263

特徴を決定した方法：E

他の情報：835 番目のR はG またはA を示し、836 番目、902 番目および923 番目のY はC またはT を示し、同時に、835 番目のR がG であり、836 番目、902 番目および923 番目のY がC であることはない。

【0125】

配列

GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGGGT TCCTCGCTTG AGAGTGGGA ACGCATTAGA 60  
 AACGTGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGAA ATAATGTCGT GGTGTCTGTC 120  
 TCCGCAATGG GAGACACCAC GGATGAGCTT CTAGAACTTG CTGCGGCAGT GAATCCCGTT 180  
 CCGCCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCTG ACTGCTGGTG AGCGTATTTC TAACGCTCTC 240  
 GTCGCCATGG CTATTGAGTC CCTGGGTGCA GAGGCTCAAT CTTTACCGG TTCTCAGGCT 300  
 GGTGTGCTCA CCACCGAGCG TCACGGAAAC GCACGCATTG TTGATGTCAC TCCAGGTGCT 360  
 GTGCGTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCATTGTTG CTGGTTTCCA GGGTGTCAAT 420  
 AAGGAAACCC GCGATGTCAC CACGTTGGT CGCGGTGGTT CTGATACCAC TGCAGTTGCA 480  
 TTGGCAGCTG CTCTGAACGC TGATGTGTGT GAGATTACT CAGATGTGA CGCGGTGTAC 540  
 ACCGCTGACC CGCGATCGT TCCTAATGCT CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTTCGAAGAA 600  
 ATGCTGGAAC TTGTGCTGT TGGCTCCAAG ATTTTGGTGC TACGCAGTGT TGAATACGCT 660  
 CGTGCAATTCA ATGTGCACT TCGGTACGC TCGTCTTATA GCAATGATCC CGGCACTTTG 720  
 ATTGCCGGCT CTATGGAGGA TATTCCTGTG GAAGAAGCAG TCCTACCGG TGTGCAACC 780  
 GACAAGTCCG AAGCCAAAGT AACGTTCTG GGTATTTCCG ATAAGCCAGG CGAGRYTGCG 840  
 AAGGTTTTCC GTGCGTTGGC TGATGCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900  
 TYCTCTGTGG AAGACGGCAC CAYGACATC ACGTTCACCT GCGCTCGCTC TGACGGACGC 960  
 CGTGGATGG AGATCTTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTTAC 1020  
 GACGACCAGG TCGGCAAGT CTCCCTCGTG GGTGCGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080  
 ACCGAGAGT TCATGGAAGC TCTGCGGAT GTCAACGTGA ACATCGAATT GATTTCCACC 1140  
 TCTGAGATCC GCATTTCCGT GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGCAGTGCA 1200  
 CTGCATGAGC AGTTCCAGCT GGGCGCGGAA GACGAAGCCG TCGTTTATGC AGGCACCGGA 1260  
 CGC 1263

【0126】配列番号：7

配列の長さ：421

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：プレバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-421

特徴を決定した方法：E

他の情報：279 番目のAAA はAla またはThr またはVal を示し、301 番目のYYYはSer またはPhe を示し、308 番目のZZZ はThr またはIle を示し、同時に、279 番目のAAA がAla であり、301 番目のYYY がSer であり、308 番目のZZZがThr であることはない。

【0127】

配列

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala



## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のルーリジンによるフィードバックインヒビションの解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の制限酵素による切断点地図。

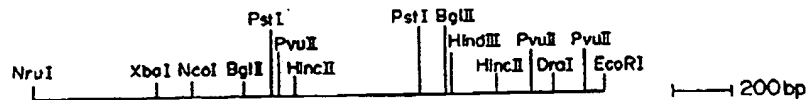
【図2】大きさが約1.7 kbの本発明DNA断片の塩基配列決定のための概略図。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-AK835の制限酵素切断点地図。

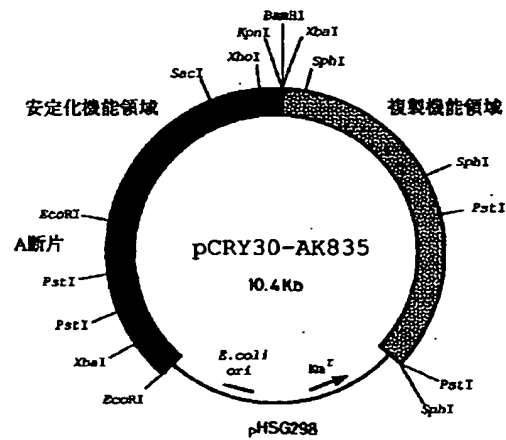
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

(C 1 2 P 13/08

C 1 2 R 1:13)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 小浜 恵子  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 久留主 泰朗  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内  
(72)発明者 湯川 英明  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
三菱油化株式会社筑波総合研究所内